

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Kanker atau neoplasma, adalah suatu penyakit pertumbuhan sel karena di dalam organ tubuh timbul dan berkembang biak sel-sel baru yang tumbuh abnormal, cepat, dan tidak terkendali dengan bentuk, sifat, dan gerakan yang berbeda dari sel asalnya, serta merusak bentuk dan fungsi organ aslinya (Dalimartha, 2004). Kanker payudara merupakan jenis kanker yang paling banyak ditemui pada wanita. Menurut WHO 8-9% wanita akan mengalami kanker payudara. Setiap tahun lebih dari 250,000 kasus baru kanker payudara terdiagnosa di Eropa dan kurang lebih 175,000 di Amerika Serikat. WHO memperkirakan sepanjang tahun 2000 sebanyak 1,2 juta wanita terdiagnosis kanker payudara dan lebih dari 700,000 meninggal karenanya. Belum ada data statistik yang akurat di Indonesia, namun data yang terkumpul dari rumah sakit menunjukkan bahwa kanker payudara menduduki ranking pertama diantara kanker lainnya pada wanita (Sulistid, 2005).

Obat anti kanker yang ideal seharusnya cepat membunuh sel kanker tanpa membahayakan jaringan normal. Sampai sekarang belum ditemukan obat-obatan yang memenuhi kriteria tersebut (Katzung, 1995). Meskipun penemuan dan pemakaian kemoterapi untuk pengobatan kanker menunjukkan hasil yang cukup baik, namun obat tersebut mempunyai efek samping dan toksisitas yang sangat besar. Dewasa ini usaha pengobatan penyakit kanker dengan tanaman obat tradisional lebih disukai, selain biayanya murah dan mudah didapat, juga karena efek samping yang relatif kecil (Mangan, 2003). Prinsip tanaman obat yang digunakan dalam pengobatan kanker berfungsi menghambat pertumbuhan kanker, menghancurkan kanker, dan memperbaiki fungsi organ vital yang rusak oleh kanker (Mardiana, 2004).

Srikaya merupakan salah satu tanaman yang memiliki potensi untuk dijadikan sebagai sumber pengobatan. Daun srikaya merupakan salah satu bagian

dari tanaman srikaya yang diduga memiliki aktivitas antikanker. Berdasarkan data empiris, daun srikaya dapat digunakan sebagai astringen, antiradang, antelmintik, antifertilitas, zat pemicu pematangan bisul dan antitumor (Dalimartha, 2002). Ekstrak kloroform daun srikaya menunjukkan efek toksik terhadap larva *Artemia salina* sebesar 98% dengan nilai LC_{50} 1,77 $\mu\text{g/mL}$ (Wahyono, 1995). Ekstrak etanol dan fraksi kloroform daun srikaya memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dengan nilai LC_{50} masing-masing sebesar 7,6948 $\mu\text{g/mL}$ dan 4,5467 $\mu\text{g/mL}$ (Djajanegara *et al.*, 2009).

Isolasi dan pemurnian ekstrak biji, daun dan ranting tanaman srikaya (*Annona squamosa* L.) menghasilkan senyawa aktif yaitu asetogenin (Spurr, 2010). Asetogenin adalah senyawa poliketida yang bersifat nonpolar dengan struktur 30 – 32 rantai karbon tidak bercabang yang terikat pada gugus *5-methyl-2-furanone*. Rantai *furanone* dalam gugus *hydrofuranone* pada C23 memiliki aktivitas sitotoksik (Gonzalez, 2002). Squamostatin-D merupakan senyawa turunan asetogenin yang didapat dari ekstraksi biji srikaya dengan etanol. Isomer squamostatin-D memiliki aktivitas sitotoksik terhadap A-549 (*human lung carcinoma*), MCF-7 (*human breast carcinoma*) dan PC-3 (*human prostate adenocarcinoma*) (Yang *et al.*, 2008). Hasil penelitian tersebut memberikan indikasi bahwa terdapat senyawa antikanker dalam ekstrak beberapa bagian tanaman srikaya. Berdasarkan hal tersebut di atas, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui aktivitas sitotoksik fraksi semipolar ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* L.) terhadap sel kanker T47D khususnya pada serta mengetahui golongan senyawa yang terkandung di dalam fraksi semipolar ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* L.).

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah, maka rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu :

1. Apakah fraksi semipolar ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* Linn.) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D dan berapa nilai IC_{50} -nya?
2. Golongan senyawa kimia apakah yang terkandung di dalam fraksi semipolar ekstrak etanol daun srikaya tersebut?

C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang dan rumusan masalah, maka tujuan pada penelitian ini adalah :

1. Mengetahui aktivitas sitotoksik fraksi semipolar ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* Linn.) terhadap sel T47D menggunakan metode MTT Assay dengan menghitung IC_{50} .
2. Mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam fraksi semipolar ekstrak etanol daun srikaya dengan profil kromatografi lapis tipis.

D. Tinjauan Pustaka

1. Tanaman srikaya (*Annona squamosa* Linn.)

a. Kedudukan tanaman srikaya dalam sistem tumbuhan

Divisio : Spermatophyta

Subdivisio : Angiospermae

Classis : Dicotyledonae

Ordo : Annonaceae

Familia : *Annona*

Genus : *Annona squamosa* Linn.

b. Morfologi tanaman srikaya

Pohon atau perdu, tinggi 2-7 m. Daun elliptis memanjang sampai bentuk lanset tumpul. Bunga 1-2 berhadapan atau di samping daun. Daun kelopak segitiga, waktu kuncup bersambung secara katup (klepsgewijs), kecil. Daun

mahkota yang terluar berdaging tebal, panjang 2-2,5 cm, dari putih kuning, dari pangkal yang berongga akhirnya ungu. Daun mahkota terdalam sangat kecil atau tidak ada. Benang sari banyak, putih. Bakal buah banyak, ungu tua. Buah majemuk lk bentuk bola, garis tengah 5-10 cm, berlilin. Biji masak hitam mengkilat. Daging buah-buahan dari Hindia Barat (Van Steenis, 2005). Tanaman srikaya dapat dilihat pada Lampiran 1.

c. Nama daerah

Annona squamosa Linn. (Famili Annonaceae) di Indonesia umumnya dikenal dengan nama srikaya, disamping itu tumbuhan ini dikenal pula dengan nama daerah, seperti delima bintang (Aceh), Sarikaya (Sunda), Serkaya (Jawa), srikaya kebo (Sumbawa), nagametawata (Sumba), garoso (Bima), atis (Sulawesi Utara, Tidore) (Anonim, 1995; Dalimartha, 2002; Sangat, 2000).

d. Kandungan kimia dan kegunaan

Tanaman srikaya sudah dipakai sejak lama sebagai obat alam untuk mengobati berbagai penyakit. Daun srikaya (*Annona squamosa* Linn.) di Cina digunakan untuk pengobatan nyeri dan bengkak (C-Ming, 1997). Biji buah dan daunnya di India digunakan sebagai obat untuk menggugurkan kandungan atau abortifasien, insektisida, dan racun ikan, sedangkan akarnya efektif sebagai pencakar atau purgative dan obat disentri (Rahman, 2005). Ekstrak etanol buah srikaya menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri gram positif seperti *S. aureus* dan *S. Pneumoniae* (Au *et al*, 2003). Tanaman ini dilaporkan mengandung banyak kandungan senyawa kimia seperti glikosida, alkaloids, saponin, flavonoid, tannin, karbohidrat, protein, senyawa fenol, phytosterol, dan asam amino. Asetogenin yang juga merupakan senyawa alami dapat diisolasi dari tanaman srikaya dan menunjukkan berbagai aktivitas biologi seperti sitotoksik, antiparasit, pestisida, dan aktivitas immunosupresif (Yang *et al*., 2008). Bagian daun dari tanaman ini mengandung 4-(2-nitro-ethyl 1)-1-6-((6-o- β -D-xylopyranosyl- β -D glucopyranosyl)-oxy) benzene, Anonaine, Benzyltetrahydroisoquinolone, dan lain-lain (Pandey *et al*, 2011).

Penelitian mengenai aktivitas biologis bagian tanaman srikaya telah banyak dilakukan. Ekstrak daun *Annona squamosa* mampu membunuh *Ascarida*

galli, sebaliknya infusa daunnya tidak memiliki kemampuan membunuh (Dalimartha *et al.*, 2001). Hasil penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa ekstrak etanol dan fraksi kloroform daun srikaya memiliki efek ketoksikan terhadap larva *Artemia salina* dan sel HeLa (Djajanegara, 2009).

e. Penelitian sebelumnya

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa bagian-bagian dari tanaman srikaya memiliki aktivitas sitotoksik, sehingga sangat berpotensi untuk dikembangkan menjadi obat antikanker. Isolasi dan pemurnian ekstrak biji, daun dan ranting tanaman srikaya (*Annona squamosa* L.) menghasilkan senyawa aktif yaitu asetogenin (Spurr, 2010). Daun srikaya (*Annona squamosa* L.) yang diekstraksi dengan pelarut sikloheksan juga memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa (Nguyen-Pouplin *et al.*, 2007). Ekstrak organik (diklorometan) 2-5% dan ekstrak air 10-25% dari biji srikaya (*Annona squamosa* L.) menginduksi apoptosis sel MCF-7 (kanker payudara), K-562 (sel leukemia) dan sel tumor BC-8 dengan meningkatkan *reactive oxygen species* (ROS), menurunkan tingkat *glutathione* (GSH), aktivasi caspase-3 dan menurunkan aktivitas gen antiapoptosis Bcl-2 dan Bcl_{XL} (Pardhasaradhi, 2004).

Asetogenin merupakan senyawa kimia golongan poliketida dengan 35-37 rantai karbon. Struktur umumnya terdiri dari rantai panjang alkil dengan gugus γ -lakton, umumnya 2,4-disubstitusi, dan variasi jumlah cincin *tetrahydrofuran* dan *tetrahydropyran* (Cunha *et al.*, 2009). Menurut Yang *et al.*, (2008), secara khusus senyawa aktif asetogenin memiliki aktivitas sitotoksik tersendiri yaitu dengan menurunkan level ATP melalui penghambatan kompleks 1 mitokondria dan penghambatan oksidase NADH pada membran plasma dari sel kanker. Penghambatan produksi ATP tersebut merupakan proses awal dari apoptosis (Kojima *et al.*, 2009).

2. Sel T47D

Sel T47D merupakan *continous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara wanita berusia 54 tahun. Sel ini sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan

frozen stock jika terjadi kontaminasi (Burdall *et al*, 2003). Sel kanker T47D merupakan sel kanker payudara *Estrogen Receptor/Progesteron Receptor*-positif. Sel T47D mengekspresikasi *mutant* P53 dan klon yang diturunkannya memiliki sensitivitas terhadap stimulasi efek estradiol. Sel T47D memiliki satu kopi dari *missense mutation* pada residu 194 (*zinc-binding domain*, L2) sehingga p53 kehilangan fungsinya untuk berikatan dengan elemen DNA dan mengakibatkan hilangnya kemampuan regulasi siklus sel (Schafer *et al*, 2000).

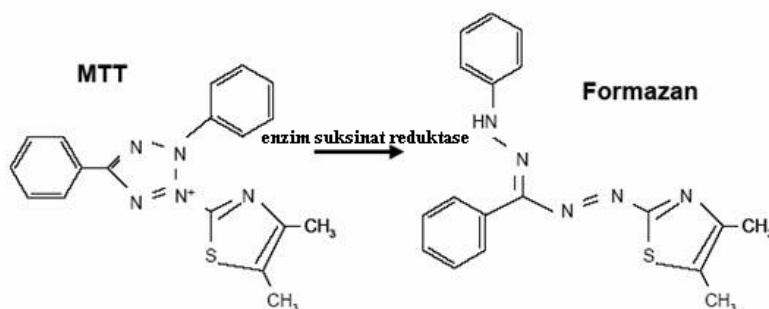
3. Uji sitotoksik

Uji sitotoksik merupakan pengembangan untuk mengidentifikasi obat sitotoksik baru atau deteksi obat dengan aktivitas antitumor. Dasar dari percobaan ini antara lain bahwa sistem penetapan aktivitas biologis seharusnya memberikan kurva dosis respon yang menunjukkan hubungan lurus dengan jumlah sel. Informasi yang diperoleh dari kurva seharusnya berhubungan dengan efek *in vivo* dari obat sitotoksik yang sama. Sitotoksik senyawa merupakan syarat aktivitas antikanker (Burger, 1970).

Uji sitotoksik dapat menggunakan parameter IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan pertumbuhan sel sebesar 50% dari populasi dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Nilai IC_{50} dapat menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik. Semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Melannisa, 2004).

Uji sitotoksik dapat dilakukan menggunakan metode *MTT Assay*. Metode ini adalah metode kolorimetri yang didasarkan pada pembentukan kompleks warna antara MTT dengan sel T47D yang hidup untuk mengukur proliferasi (pertumbuhan) sel. MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida) adalah garam tetrazolium yang dapat larut dalam air dan akan menghasilkan warna kuning. MTT dapat dipecah menjadi formazan yang berwarna ungu oleh suksinat tetrazolium reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi mitokondria dan aktif pada sel hidup. Enzim mitokondria tersebut memetabolisme garam tetrazolium, sehingga terjadi pemutusan cincin tetrazolium oleh enzim

dehidrogenase yang menyebabkan tetrazolium berubah menjadi formazan yang tidak larut dalam air dan berwarna ungu (Mostmann, 1983 *cit* Artati, 2007).



Gambar 1. Reaksi reduksi MTT menjadi Formazan oleh enzim suksinat reduktase

Proses metabolisme sel-sel hidup akan menghasilkan enzim suksinat reduktase di mitokondria. Enzim ini akan beraksi dengan MTT dan membentuk kristal formazan yang berwarna ungu yang jumlahnya sebanding dengan jumlah sel hidup.

E. Landasan Teori

Hasil penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa, srikaya (*Annona squamosa* L.) mempunyai potensi sebagai bahan alami antikanker. Senyawa-senyawa asetogenin (squamostatin A, B, C, dan D) serta *annotemoyin*-1 dan -2, dan glukopiranosid kolesteril pada srikaya memiliki efek sitotoksik (Yang *et al.*, 2009, Rahman *et al.*, 2005) dan antitumor secara *in vivo* (Spurr, 2010). Senyawa asetogenin yang berasal dari Annonaceae memperlihatkan aktivitas antitumor 40-300 kali lebih kuat dibandingkan dengan taksol (C-Ming, 1997).

Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa ekstrak kloroform daun srikaya menunjukkan efek toksik terhadap larva *Artemia salina* sebesar 98% dengan nilai LC_{50} 1,77 $\mu\text{g/mL}$ (Wahyono, 1995). Ekstrak etanol daun srikaya dan fraksi kloroformnya menunjukkan adanya aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dengan nilai LC_{50} 7,69 $\mu\text{g/mL}$ dan 4,55 $\mu\text{g/mL}$ (Djajanegara *et al.*, 2009). Suatu senyawaisomer squamostatin-D yang didapat dari ekstrak etanol biji srikaya dan

dipartisi dengan kloroform, petroleum eter dan n-BuOH memperlihatkan aktivitas sitotoksik terhadap MCF-7 (*human breast carcinoma*) dengan nilai $ED_{50} 1,62 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ (Yang *et al.*, 2008).

Berbagai senyawa kimia terkandung dalam bagian tanaman srikaya. Isolasi dan pemurnian ekstrak biji, daun dan ranting tanaman srikaya (*Annona squamosa* L.) menghasilkan senyawa aktif yaitu asetogenin (Spurr, 2010). Uji fitokimia terhadap ekstrak etanol daun srikaya yang difraksinasi dengan etil asetat menunjukkan adanya senyawa kimia *annonaine* yang merupakan golongan alkaloid (Magadula, 2009). Penelitian Rahayu *et al.*, 1993, menunjukkan daun srikaya yang diekstrak dengan pelarut heksan, kloroform dan methanol mengandung senyawa kimia fenol, alkaloid, steroid, flavonoid, tannin dan saponin.

Berdasarkan penelitian di atas, diharapkan dari penelitian ini akan diketahui potensi aktivitas sitotoksik fraksi semipolar dari ekstrak etanol daun srikaya terhadap sel kanker T47D.

F. Hipotesis

Fraksi semipolar ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* Linn.) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D dan memiliki kandungan senyawa kimia asetogenin, alkaloid, flavonoid, polifenol, dan tannin.